

Aus der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Johannes Gutenberg - Universität in Mainz

Die Wirkung von Etacrynsäure
am isolierten Rattenkolon

Inauguraldissertation

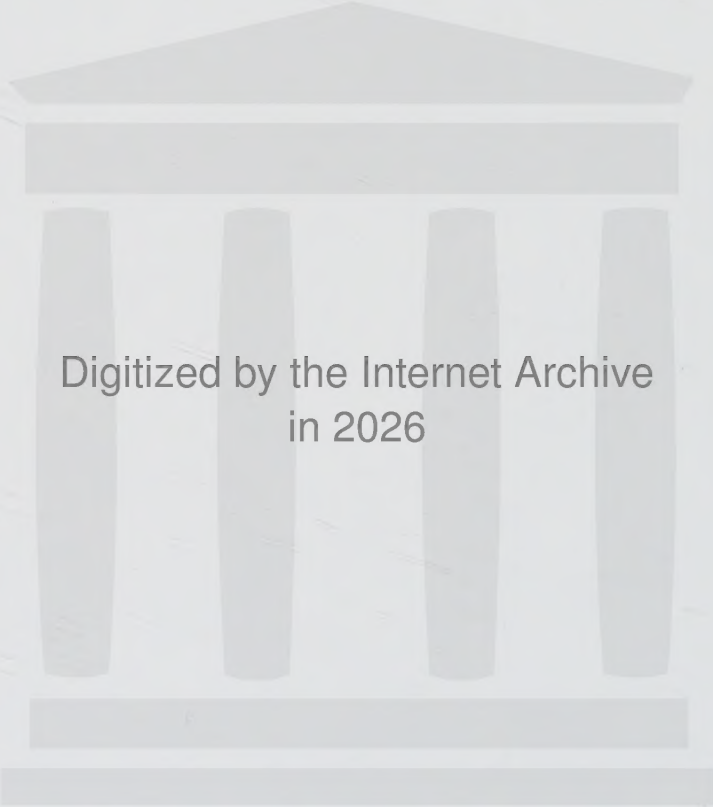
zur Erlangung der Würde des Doktors der Medizin
der Johannes Gutenberg - Universität in Mainz
dem Fachbereich Medizin vorgelegt

von Hans-Georg Albrecht

aus Dortmund

Mainz, 1981





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552620_0024

Aus der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Johannes Gutenberg - Universität in Mainz

Die Wirkung von Etacrynsäure
am isolierten Rattenkolon

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Würde des Doktors der Medizin
der Johannes Gutenberg - Universität in Mainz
dem Fachbereich Medizin vorgelegt

von Hans-Georg Albrecht

aus Dortmund

Mainz, 1981



Dekan:	Professor Dr. med. K.-H. Bäßler
1. Gutachter:	Professor Dr. med. R. Wanitschke
2. Gutachter:	Professor Dr. med. K. Ewe

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Oktober 1981

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung	1
II.	Material und Methode	
	1. Bestimmung der Elektrolyt- und Wasserabsorption	4
	2. Bestimmung der Na^+ - K^+ -ATPase- Aktivität im Mukosagewebe	8
	3. Bestimmung von cyclischem AMP im Mukosagewebe	9
	4. Statistik	12
III.	Ergebnisse	13
IV.	Diskussion	20
V.	Zusammenfassung	24
VI.	Literaturverzeichnis	25

I. Einleitung

=====

Während einer diuretischen Therapie mit Etacrynsäure (2,3-Dichlor-4-(2-methylenbutyryl)-phenoxy-essigsäure) wurden in einigen Fällen Diarrhöen als unerwünschte Nebenwirkung beobachtet (Hilton u.Kessler, 1964; Hagedorn et al., 1965; Cooperman u.Rubin, 1973). Die Beeinflussung von Transportsystemen kann in der Niere und analog in der intestinalen Schleimhaut unter der Einwirkung von Diuretika auf den gleichen physiologischen und/oder pathophysiologischen Prinzipien beruhen (Rummel u. Stupp, 1962; Robinson u. Förster, 1968) und damit die Durchfälle erklären.

In der folgenden Arbeit wird dosisabhängig die Wirkung von Etacrynsäure auf den Wasser- und Elektrolyt-transfer an der isolierten Kolonmukosa der Ratte untersucht.

Während einige Autorengruppen an der Rattenniere keine Absorptionshemmung für Na^+ und Wasser durch Etacrynsäure fanden (Beyer et al., 1965; Wilczewski et al., 1974) konnte in anderen Studien an der selben Spezies eine Elimination von Na^+ und K^+ - allerdings in 50fach höheren Dosen - festgestellt werden (Ebel et al., 1972; Senft et al., 1968; Zins et al., 1968). An der Rattenniere beginnt die absorptionshemmende Wirkung für Wasser und Elektrolyte bei 10^{-4}M Etacrynsäure; der maximale Effekt ist schon bei $5 \times 10^{-4}\text{M}$ erreicht (Bowman et al., 1973). Eine 50%ige Hemmung der Na-Absorption ist bei einer Konzentration von $2 \times 10^{-4}\text{M}$ gefunden worden (Schurek et al., 1975).

Am Dünndarm der Ratte hatte $2 \times 10^{-4}\text{M}$ Etacrynsäure keinen Einfluß auf den Na-Transport (Strombeck u. Ingraham, 1972), während für 10^{-3}M in vivo und auch in vitro Absorptionshemmungen festgestellt werden konnten (Robinson u. Förster, 1968).

Mögliche Angriffspunkte der Beeinflussung des transepithelialen Wasser- und Elektrolyttransportes sind die Natrium-Kalium-aktivierbare Adenosintriphosphatase ($\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$) (Katz u. Epstein, 1968) und das cyclische Adenosinmonophosphat (cAMP), welches als sog. "second messenger" auch im Gastrointestinaltrakt wirkt (Robinson et al., 1968; Sutherland et al., 1968; Fülgraff u. Meiforth, 1974; Kimberg, 1974).

Die Aktivität der $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ in der Rattenniere korreliert mit den Absorptionsvorgängen am renalen Tubulus (Katz u. Epstein, 1967). An der Hundeniere zeigte Etacrynsäure in hohen Konzentrationen nur geringe Wirkung auf die $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ (Nechay et al., 1967). Duggan u. Noll (1965) wiesen eine 50%ige Hemmung der Gesamt-ATPase bei $5 \times 10^{-4} \text{M}$ Etacrynsäure an der Rattenniere nach. Davis (1970) arbeitete mit der selben Konzentration an der Niere des Meerschweinchens und fand eine 14%ige Aktivitätseinbuße der $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$. In vitro durchgeführte Untersuchungen an der Ratte zeigen bei 10^{-3}M Etacrynsäure eine Hemmung der $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ (Ebel et al., 1972). Es gibt damit Hinweise, daß die $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ bei der diuretischen Wirksamkeit der Etacrynsäure eine Rolle spielen könnte (Nechay, 1974).

Erhöhte mukosale Konzentrationen von cAMP können mit sekretorischen Durchfällen in Zusammenhang gebracht werden (Kimberg, 1974). Wie Field (1971) am Kaninchen zeigte, ist cAMP für die Regulierung der Absorptions- und Sekretionsvorgänge mit verantwortlich. An der Mukosa des Kaninchendünndarms wurde der durch Cholera-Enterotoxin hervorgerufene Anstieg des cAMP durch Etacrynsäure wieder aufgehoben (Al-Awqati et al., 1974). Dieser anti-sekretorische Effekt der Etacrynsäure konnte auch nach Applikation von Prostaglandin E_1 und cAMP nachgewiesen werden (Matuschansky et al., 1976). An der Kolonmukosa der Ratte steigt die cAMP-Aktivität nach Behandlung mit Taurochenodesoxycholsäure; damit wird die steigende Wasser- und Elektrolytsekretion einem Effekt des cAMP zu-

geschrieben (Binder et al., 1975). 2×10^{-4} M Etacrynsäure vermindert den cAMP-Gehalt in der Rattenniere um ca. 50 % (Jakobs et al., 1972). Ebel et al. (1973) und Ebel (1974) konnten eine Hemmung der Adenylcyclase bei 10^{-3} M Etacrynsäure im Gewebe der Rattenniere bestätigen. Senft et al. (1968) wiesen darauf hin, daß in vivo keine Abnahme der Phosphodiesterase-Aktivität gemessen wurde.

In Kenntnis der genannten Befunde wurde in der vorgelegten Studie untersucht, ob die laxierende Wirkung der Etacrynsäure analog durch eine Beeinflussung der Mechanismen der cAMP-medierten intestinalen Sekretion und / oder der Hemmung der Na^+ - K^+ -aktivierbaren ATPase an Intestinaltrakt bedingt ist.

II. Material und Methode

=====

1. Bestimmung der Elektrolyt- und Wasserabsorption:

In der Versuchsreihe wurden männliche Wistar-Ratten mit einem Gewicht von 170 bis 420 g verwendet. Bis zum Versuchsbeginn hatten die Tiere freien Zugang zu Trockenfutter (Altromin^R, Fa. Altrogge, Lage) und Wasser.

Die Narkose wurde mit Äther durchgeführt. Die Bauchhöhle wurde eröffnet, das Kolon entnommen und sogleich in eisgekühlter und begaster plasmaisotoner Elektrolytlösung gespült.

Nach der Methode von Parsons u. Paterson (1960;1965) wurden äußere Muskelschicht und Serosa von der Mukosa

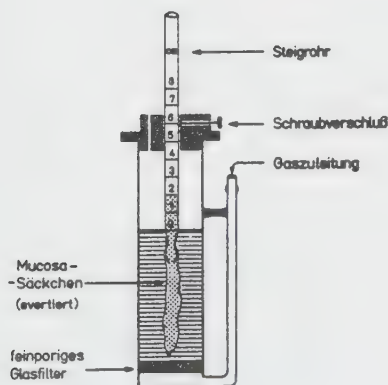


Abbildung 1: Darstellung der Versuchsanordnung nach Parsons u. Paterson

getrennt. Es erfolgte eine zirkuläre statt einer longitudinalen Inzision als Modifikation der Methode (Wanitschke et al., 1977).

Der gewendete Mukosaschlauch wurde an einem Ende ligiert, das andere an einem graduierten Glasrohr befestigt.

Das Präparat wurde in die Versuchsanordnung nach Parsons u. Paterson (Abbildung 1) montiert. Die Außenlösung (50 ml) wurde mit 95% O₂ - 5% CO₂ begast; außerdem war eine konstante Temperatur von 37°C über die gesamte Versuchsdauer gewährleistet.

Über das Steigrohr wurden die Kolonsäckchen gefüllt, so daß der hydrostatische Druck der Außenlösung ausgeglichen war (Wanitschke et al., 1977).

Das Inkubationsmedium enthielt (in mM/l): NaCl 112, KCl 4,5, NaHCO₃ 25, Glukose 12,2. Die Osmolarität der Lösung betrug 280 mosm/l, der pH 7,4 bei 95% O₂ - 5% CO₂-Begasung.

Die Volumenverschiebungen des Wassers wurden mit Hilfe von Polyäthylenglykol (Polyethylene-1,2-¹⁴C-glycol, MW 4000, spez. Aktivität 0,38 mCi/g; New England Nuclear; 5 µCi/l; Zusatz von 5 g/l inaktives PÄG 4000, Serva Feinbiochemica, Heidelberg) auf der Serosaseite bestimmt (Jakobson et al., 1963; Shields et al., 1968; Wingate et al., 1972).

Nach zweistündiger Inkubationsdauer wurde der Inhalt des Kolonsäckchens aufgefangen; Na⁺ und Cl⁻ wurden aus dem Überstand nach Zentrifugation (3600 rpm über 10 min) bestimmt. Aus der Konzentrationsänderung der ¹⁴C-PÄG-Aktivität ergab sich die Volumenverschiebung. Zur Bestimmung des fettfreien Trockengewichtes wurde das Kolonpräparat über Nacht in Äther aufbewahrt und bei 60°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

In der Regel wurde die Etacrynsäure auf der mukosalen Seite des Präparates (entsprach der Außenseite des Kolonsäckchens) angeboten, in zwei Versuchen auch auf der serosalen Seite.*

* An dieser Stelle sei der Fa. Sharp & Dohme GmbH, München, für die großzügige Bereitstellung von Hydromedin^R (Etacrynsäure) für diese Untersuchungen gedankt.

Na^+ wurde flammenphotometrisch (Flammenphotometer, ima-Analysengeräte, Fernwald-Annrod) und Cl^- titrimetrisch (Chloridmeter, Eppendorf, Hamburg) bestimmt.

Der Flüssigszintillationszähler (Flüssigszintillationsspektrometer Betaszint BF 5000, berthold, Wildbad) errechnete die ^{14}C -PÄG-Aktivität. Zuvor wurden die Proben in ein Szintillationsmedium (Instagel, Packard Instruments-Company, Illinois, U.S.A.) pipettiert.

Die Osmolalität wurde durch Gefrierpunktserniedrigung (Osmometer Knauer, Oberursel/Taunus) gemessen.

Auswertung:

Die Nettobewegungen ergaben sich wie folgt:

$$\text{für Wasser: } I_{\text{H}_2\text{O ms}}^{\text{net}} = \Delta G \times \left(\frac{[\text{PAG}_{\text{SA}}]}{[\text{PAG}_{\text{SE}}]} - 1 \right) / t \times \text{T.G.}$$

$$\text{für Ionen: } I_{\text{i ms}}^{\text{net}} = [\text{I}_{\text{SE}}] \times \text{H}_2\text{O}_{\text{SE}} - \Delta G \times [\text{I}_{\text{SA}}] / t \times \text{T.G.}$$

dabei bedeuten:

$I_{\text{H}_2\text{O ms}}^{\text{net}}$ = Netto-Wasser-Absorption von mukosal nach
serosal (ml/g x h)

$I_{\text{i ms}}^{\text{net}}$ = Netto-Ionen-Absorption von mukosal nach
serosal ($\mu\text{val/g} \times \text{h}$)

ΔG = gravimetrisch bestimmte Lösungsmenge auf
der serosalen Seite zu Versuchsbeginn (g)

$[\text{PAG}_{\text{SA}}]$ = ^{14}C -PAG-Aktivität zu Versuchsbeginn
(serosal) (cpm)

$[\text{PAG}_{\text{SE}}]$ = ^{14}C -PAG-Aktivität zu Versuchsende
(serosal) (cpm)

$[\text{I}_{\text{SA}}]$ = Ionen-Konzentration auf der serosalen Seite
zu Versuchsbeginn (mval/l)

$[\text{I}_{\text{SE}}]$ = Ionen-Konzentration auf der serosalen Seite
zu Versuchsende (mval/l)

$\text{H}_2\text{O}_{\text{SE}}$ = errechnete Lösungsmenge auf der serosalen
Seite zu Versuchsende (ml)

t = Versuchsdauer (h)

T.G. = fettfreies Trockengewicht (g)

2. Bestimmung der $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase-Aktivität im Mukosagewebe:

Nach zweistündiger Inkubation (s.o.) wurde das Kolonpräparat eröffnet, mit Filterpapier abgetupft, die Mukosa mit einem Deckgläschen abgeschabt und in die etwa 10fache Menge Isolationsmedium (pH 7,45, 250 mM/l Saccharose, 10 mM/l Triäthanol-HCl, 5 mM/l Titriplex II) gefüllt.

Die anschließende Homogenisation des Gewebes erfolgte unter weiterer Kühlung mit einem Potter-Homogenisator (Braun, Melsungen) bei maximaler Umdrehung.

In gleichen Homogenatmengen wurden die Enzymaktivitäten als Mittelwerte von Dreifachbestimmungen errechnet. Tris-Puffer (75 mM/l, pH 7,6, 20°C) diente zur Verdünnung des Homogenats. Die Aktivität der Mg^{++} -ATPase und $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase wurde in vier verschiedenen Ansätzen gemessen (Loeschke et al., 1974): eine Bestimmung in Gegenwart von Mg^{++} , eine zweite mit Mg^{++} und Ouabain, die dritte mit Mg^{++} , Na^+ und K^+ im Ansatz. Der vierte Ansatz enthielt Mg^{++} , Na^+ , K^+ und Ouabain (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Ansätze zur Bestimmung der $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -aktivierbaren ATPase

	Mg^{++}	Na^+	K^+	Ouabain
		(mMol/l)		
I	6	-	-	-
II	6	-	-	2
III	6	100	20	-
IV	6	100	20	2

Die Differenz zwischen der Aktivität im Ansatz I, II und IV (= Mg^{++} -ATPase) und solcher im Ansatz III (= $\text{Mg}^{++}\text{-Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase) wurde als $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase definiert.

Als Substrat wurde allen Ansätzen 3,7 mMol/l Adenosin-5'-triphosphat zupipettiert.

Durch eineinhalbminütiges Abkochen im Wasserbad bei 100°C wurde nach 30 min bei 37°C die Enzymreaktion unterbrochen. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation über zwei Minuten (Eppendorf-Zentrifuge).

Nach der Methode von Fiske u. Subbarow (1925) wurden Phosphatreagenz (50,4 mg Ammoniumheptamolybdat in 6 ml 2 N H₂SO₄ + 200 mg Ascorbinsäure in 1 ml Aqua dest.) und der Überstand im Eisbad gemischt und anschließend über 7 min bei 60°C inkubiert.

Es folgten die Abkühlung im Eisbad und die Messung der Extinktion bei 830 nm gegen Leerwert am gleichen Tag (Eppendorf-Photometer, Eppendorf Gerätebau, Metheler & Hinz GmbH, Hamburg). Zur Ermittlung der Phosphatkonzentration diente eine Eichkurve.

Coomassiebrilliantblau (Coomassie-Brilliant-Blue G 250, Chroma-Gesellschaft, Schmid GmbH & Co., Stuttgart-Untertürkheim) wurde zur Bestimmung der Proteinkonzentration im Homogenat nach der Methode von Sedmark u. Grossberg (1977) benutzt.

3. Bestimmung von cyclischem 3', 5'-Adenosinmonophosphat im Mukosagewebe:

Als Bestimmungsverfahren diente ein Radioimmunoassay (Abdelhamid, 1974; Steiner et al., 1970). Zuvor wurden die Proben jedoch mittels Ionenaustauscher-Säulenchromatographie in der Methode von Schultz et al. (1974) aufgetrennt. Hierzu wurden die zuvor extrahierten Nukleotidproben über Ionenaustauscherharze geschickt.

Die Aufbereitung des Anionenaustauschers (QAE-Sephadex A-25, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) verlief wie bei Schultz bereits beschrieben.

Zur Vorbereitung des Kationenaustauschers (SP-Sephadex C-25, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) diente eine großlumige Glassäule mit kleinporigem Bodenfilter (Sarstedt-Säule). Zur Umformung des SP-Sephadex von der Na^+ -Form in die H^+ -Form war hier das SP-Sephadex in Aqua dest. aufgewollt und wurde anschließend mit 0,2 N NaOH auf einen konstanten pH-Wert des Eluats von 13 eingestellt. Nach Spülung mit Aqua dest. bis zu einem pH von 9 wurde dieser weiter bis auf 0,65 durch Zugabe von 0,2 N HCl gesenkt. Erneuter Zusatz von Aqua dest. erfolgte bis der Chlorid-Nachweis durch AgNO_3 negativ wurde. Abschließend wurde mit 70%igem Alkohol gewaschen, ehe jeweils 2 ml SP-Sephadex in mit Quarzwolle abgedichtete Trichterröhrchen (Art.-Nr. 102/2, W. Sarstedt, Nümbrecht-Rommelsdorf) umgefüllt wurden.

Das Kolonpräparat war nach zweistündiger Inkubation eröffnet, mit Filterpapier abgetupft und nach Konservierung in flüssigem Stickstoff tiefgefroren gelagert worden.

Zu Beginn der Bestimmungsreihe erfolgte unter Zugabe von 4 ml 50%igem Äthanol, 200 μl 1 M Zinkacetat und ^3H -cAMP (6000 cpm) die Homogenisation im Eisbad.

Nach Zentrifugation bei 10000 rpm über 10 min wurde der Überstand mit 100 μl 2 M NaCO_3 vermischt und das Sediment zur Proteinbestimmung verwahrt. Durch diese Maßnahme blieben cAMP und cGMP unbeeinflusst; die meisten 5'-Nukleotide wurden gemeinsam mit dem Zinkacetat präzipitiert. Der Überstand einer erneuten Zentrifugation wurde mit 6 ml Aqua dest. verdünnt. Diese 10 ml wurden auf die QAE-Sephadex-Säulen pipettiert. Mit 10 ml Aqua dest. und 6 ml 0,1 M Ammoniumformiat (mit NH_4OH auf pH 9 eingestellt) wurde nachgespült; diese Menge konnte verworfen werden.

Mit 6 ml 0,1 M Ammoniumformiat (pH 6, spontan) wurde die cAMP-Fraktion ausgewaschen. Dieses QAE-Eluat wurde auf die SP-Sephadex-Säulen übertragen und mit 2 ml Aqua dest. gespült.

Das gesamte Eluat wurde lyophilisiert (Gefriertrocknungsanlage DELTA I a, Martin Christ, Osterode am Harz). Das Ammoniumformiat war in die gut flüchtige Ameisensäure übergegangen.

Ein Radioimmunoassay (Cyclic AMP Assay Kit, Code TRK 432, Amersham-Buchler, Braunschweig) diente der Bestimmung der cAMP-Aktivitäten.

Dieses Prinzip besteht in der Konkurrenz von radioaktivem und inaktivem cAMP zur Bindung an angebotenem Proteinträger (Rindermuskelprotein) (Gilman, 1970). Es besteht umgekehrte Proportionalität zwischen dem Anteil neugebildeten, markierten Nukleotid-Protein-Komplexes und dem an nicht markiertem cAMP im Versuchsansatz. Durch Adsorption des freien Nukleotids an Aktivkohle wird das proteingebundene vom ungebundenen cAMP getrennt; anschließend wird zentrifugiert. Die Konzentration von cAMP in der unbekannten Probe ergibt sich aus der Radioaktivität im Überstand. Die "recovery" in dieser Versuchsreihe betrug 50 - 70%. Die Konzentration des unmarkierten cAMP in der Probe konnte aus einer linearen Eichkurve abgelesen werden.

Der Versuchsaufbau wurde kontrolliert, indem in der selben Bestimmungsreihe der cAMP-Gehalt des Dünndarmgewebes solcher Ratten bestimmt wurde, die zuvor mit Cholera Enterotoxin behandelt worden waren (Schafer et al., 1970; Parkinson et al., 1972; Hornyk et al., 1973; Field, 1974).

Jeweils 3 Ratten wurden 2 ml Ringerlösung bzw. 2 ml Ringerlösung + 12 µg Cholera Enterotoxin (Schwarz/Mann, Cat.-No.: 8560 Orangeburg, New York) in ca. 20 cm lange, abgebundene Dünndarmschlingen installiert. Die cAMP-Bestimmung erfolgte nach sechsständiger Inkubation in vivo.

Die Ergebnisse sind auf den nach Lowry et al. (1951) bestimmten Proteingehalt bezogen. Zur Erstellung der Eichkurve diente Rinderalbumin (Rinderalbumin, reinst, Behringwerke, Marburg/Lahn).

4. Statistik:

Die Resultate sind als Mittelwerte ($\bar{x}$) mit Standardabweichungen (s) dargestellt.

Zur statistischen Auswertung diente der Student's t - Test für unverbundene Stichproben, wobei als Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ gewählt wurde.

Die Testergebnisse wurden nicht nach der Methode von Bonferroni korrigiert und sind also nur als Hinweise auf vorhandene Unterschiede zu verstehen.

III. E r g e b n i s s e

=====

Um die Wirkung der Etacrynsäure auf den Elektrolyt- und Wassertransfer an der Dickdarmmukosa der Ratte zu zeigen, wurden sieben Konzentrationen von $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ bis zu $6 \times 10^{-3} \text{ M}$ jeweils auf der mukosalen Seite des Kolonpräparates appliziert.

Die Nettobewegungen von Na^+ , Cl^- und Wasser sowie Osmolalitätsänderungen auf der serosalen Seite des Darmes wurden nach zweistündiger Inkubation gemessen (Tabelle 2).

$5 \times 10^{-5} \text{ M}$ Etacrynsäure zeigt keine Hemmung des Elektrolyt- und Wassertransfers, während bei 10^{-4} M Lösung Absorptionshemmungen von 16% für Na^+ und 13% für Cl^- festgestellt werden. Bei der letzten Konzentration bleibt der Wassertransfer unbeeinflusst.

Absorptionshemmungsraten von 56% für Na^+ , 55% für Cl^- und 60% für H_2O findet man bei Applikation einer $5 \times 10^{-4} \text{ M}$ Etacrynsäure-Lösung. Hier ist die Dosis der halbmaximalen Absorptionseinschränkung erreicht.

Aufgrund der begrenzten Löslichkeit der Etacrynsäure in der benutzten Lösung konnte als höchste Konzentration noch $6 \times 10^{-3} \text{ M}$ untersucht werden. Die prozentualen Transportraten werden hier um 84% für Na^+ , 82% für Cl^- und 71% für Wasser gehemmt.

Die Absorptionshemmungsraten aller Konzentrationen dieser Versuchsreihe sind zu einer Dosis-Wirkungs-Kurve (Abbildung 2) zusammengestellt.

Nach zweistündiger Inkubation zeigten sich auf der serosalen Seite des Kolons stets höhere Konzentrationen für Na^+ und Cl^- als zu Versuchsbeginn. Bei niedriger Etacrynsäurekonzentration wurde dieser Konzentrationsanstieg nicht beeinflusst. Bei $5 \times 10^{-4} \text{ M}$ Etacrynsäure blieb der durchschnittliche Konzentrationsanstieg mit 10 mval/l für Na^+ gegenüber 19 mval/l im Kontrollexperiment signifikant zurück. Höhere Konzentrationen der Etacryn-

	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	Osm_{SE}	n
Kontrollen	892 $\pm$ 286	619 $\pm$ 136	5,04 $\pm$ 1,18	286 $\pm$ 14,3	6	6
ES (5 x 10 ⁻⁵ M)	911 $\pm$ 350	785 $\pm$ 355	4,95 $\pm$ 2,12	286 $\pm$ 7,2	6	6
Kontrollen	1909 $\pm$ 337	1746 $\pm$ 321	12,76 $\pm$ 2,14	255 $\pm$ 9,2	6	6
ES (10 ⁻⁴ M)	1610 $\pm$ 867	1518 $\pm$ 870	9,83 $\pm$ 5,05	258 $\pm$ 7,8	7	7
Kontrollen	1968 $\pm$ 514	1954 $\pm$ 527	10,73 $\pm$ 2,83	312 $\pm$ 10,0	9	9
ES (2 x 10 ⁻⁴ M)	1735 $\pm$ 489	1658 $\pm$ 497	9,17 $\pm$ 2,87	308 $\pm$ 12,6	7	7
Kontrollen	1054 $\pm$ 481	910 $\pm$ 418	5,28 $\pm$ 3,62	276 $\pm$ 35,0	8	8
ES (5 x 10 ⁻⁴ M)	458 $\pm$ 253 ^x	408 $\pm$ 254	2,11 $\pm$ 1,97	257 $\pm$ 14,0	7	7
Kontrollen	2800 $\pm$ 540	2565 $\pm$ 509	13,59 $\pm$ 3,10	300 $\pm$ 5,8	8	8
ES (10 ⁻³ M)	843 $\pm$ 184 ^x	725 $\pm$ 180 ^x	5,34 $\pm$ 1,51 ^x	264 $\pm$ 2,5 ^x	9	9
Kontrollen	1759 $\pm$ 834	1559 $\pm$ 790	10,37 $\pm$ 4,54	261 $\pm$ 11,3	8	8
ES (2 x 10 ⁻³ M)	531 $\pm$ 201 ^x	474 $\pm$ 156 ^x	4,71 $\pm$ 1,56 ^x	241 $\pm$ 2,7 ^x	8	8
Kontrollen	1447 $\pm$ 411	1492 $\pm$ 315	7,50 $\pm$ 2,02	309 $\pm$ 7,4	9	9
ES (6 x 10 ⁻³ M)	226 $\pm$ 110 ^x	265 $\pm$ 201 ^x	2,17 $\pm$ 0,94 ^x	290 $\pm$ 3,6 ^x	6	6

Tabelle 2: Netto-Transport von Na⁺, Cl⁻ und H₂O von mukosal nach serosal sowie Osmolalität nach Etacrynsäureapplikation auf der Mukosaseite des Kolons.

	$I_{Na}^{net} \text{ ms/t x T.G.}$	$I_{Cl}^{net} \text{ ms/t x T.G.}$	$I_{H_2O}^{net} \text{ ms/t x T.G.}$	Osm_{SE}	n
	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	
Kontrollen	1402 ± 108	1349 ± 120	$6,07 \pm 0,60$	$296 \pm 4,2$	7
ES ($10^{-3}M$)	1587 ± 102	1450 ± 94	$7,91 \pm 0,69$	$285 \pm 3,1$	9
Kontrollen	1764 ± 184	1827 ± 175	$10,29 \pm 1,01$	$306 \pm 1,8$	8
ES ($6 \times 10^{-3}M$)	1326 ± 203	1321 ± 204	$8,15 \pm 1,19$	$298 \pm 2,9$	9

Tabelle 3: Netto-Transport von Na^+ , Cl^- und H_2O von mukosal nach serosal sowie Osmolalität nach Etacrynsäureapplikation auf der Serosaseite des Kolons.

zu Tabellen 2 + 3:	$I_{Na}^{net} \text{ ms/t x T.G.}$	=	Netto-Natriumionen-Transport ($\mu\text{val x g}^{-1} \text{ x h}^{-1}$)
	$I_{Cl}^{net} \text{ ms/t x T.G.}$	=	Netto-Chloridionen-Transport ($\mu\text{val x g}^{-1} \text{ x h}^{-1}$)
	$I_{H_2O}^{net} \text{ ms/t x T.G.}$	=	Netto-Wasser-Transport ($\text{ml x g}^{-1} \text{ x h}^{-1}$)
	Osm_{SE}	=	Osmolalität am Versuchsende auf der serosalen Seite (mosm x kg^{-1})
x		=	signifikant verschieden ($\alpha = 0,05$)
n		=	Anzahl der Versuchstiere

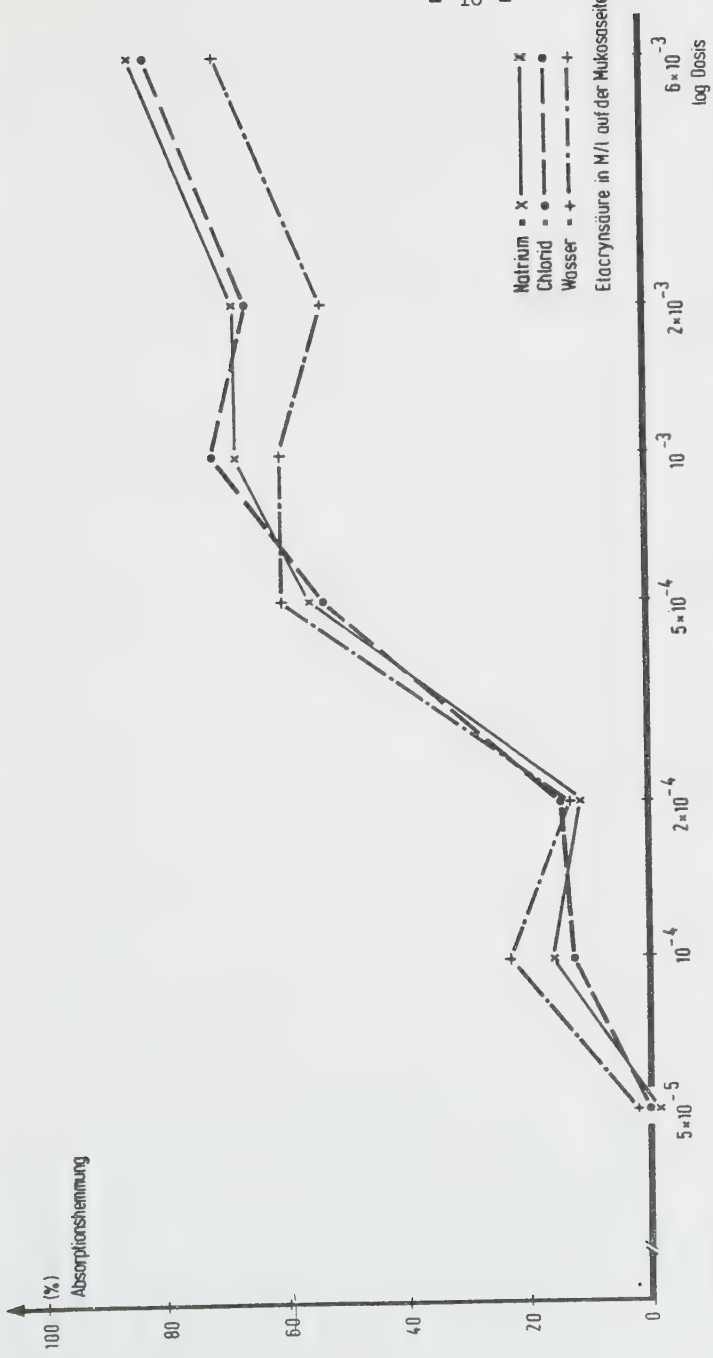


Abbildung 2

Dosis-Wirkungskurve der Absorptionshemmungsraten für Natrium-Ionen, Chlorid-Ionen und Wasser in % nach Etacrynsäureapplikation auf der Mukosaseite des Präparates (auf eine Angabe der Standardabweichungen wurde der Übersichtlichkeit wegen verzichtet).

säure machten diesen Effekt deutlicher. In max.verwendeten Konzentrationen konnte sogar ein geringer Na^+ -Konzentrationsverlust gegenüber der Ausgangskonzentration gezeigt werden (Abbildung 3a).

Bei Versuchsende in der serosalen Flüssigkeit gemessene Osmolalitäten zeigen ebenfalls diesen Effekt. Signifikante Einschränkungen des Osmolalitätsanstieges treten bei 10^{-3}M Etacrynsäure-Lösung auf (Abbildung 3b).

Versuche mit der Applikation von Etacrynsäure auf der serosalen Seite zeigen geringere Wirkungen. Bei 10^{-3}M Etacrynsäure kann man keine Hemmung des Elektrolyt- und Wassertransfers feststellen. In der höchsten verwendeten Konzentration $6 \times 10^{-3}\text{M}$ wurden die Hemmungsraten 25% für Na^+ , 28% für Cl^- und 21% für Wasser erreicht (Tabelle 3).

Da eine Beeinflussung der Transportraten über eine Hemmung der Na^+-K^+ -ATPase diskutiert werden muß, wurde die Na^+-K^+ -ATPase-Aktivität des Mukosagewebes bestimmt. 10 Kontrollen wurden ebensoviele Kolonpräparate mit $5 \times 10^{-4}\text{M}$ Etacrynsäure auf der mukosalen Seite gegenübergestellt. Bei der Messung der Na^+-K^+ -ATPase-Aktivitäten zeigte sich mit $1,64 \pm 0,62 \times 10^{-6}\text{mol P} \times \text{Protein mg}^{-1}$ nach Behandlung mit Etacrynsäure gegenüber den Kontrollwerten von $1,83 \pm 0,54 \times 10^{-6}\text{mol P} \times \text{Protein mg}^{-1}$ kein signifikanter Unterschied (Abbildung 4).

Zur Konzentrationsmessung des cAMP im Mukosagewebe wurden die Kolonpräparate mit der $5 \times 10^{-4}\text{M}$ Etacrynsäure auf der mukosalen Seite behandelt. Auf der Kontrollseite ($n = 10$) wurden $3,14 \pm 1,34 \times 10^{-12}\text{mol cAMP} \times \text{Protein mg}^{-1}$ errechnet. In der Substratgruppe ($n = 11$) wurden $3,70 \pm 1,16 \times 10^{-12}\text{mol cAMP} \times \text{Protein mg}^{-1}$, und somit keine signifikante Konzentrationsänderung gemessen (Abbildung 5).

Die im Kontrollversuch mit Cholera Enterotoxin behandelten abgebundenen Dünndarmschlingen der Ratte ($n = 3$) ergaben mit $18,28 \pm 1,77 \times 10^{-12}\text{mol cAMP} \times \text{Protein mg}^{-1}$ gegenüber $4,95 \pm 2,44 \times 10^{-12}\text{mol cAMP} \times \text{Protein mg}^{-1}$ in der Kontrolle ($n = 3$) die erwartete Aktivitätssteigerung des cAMP.

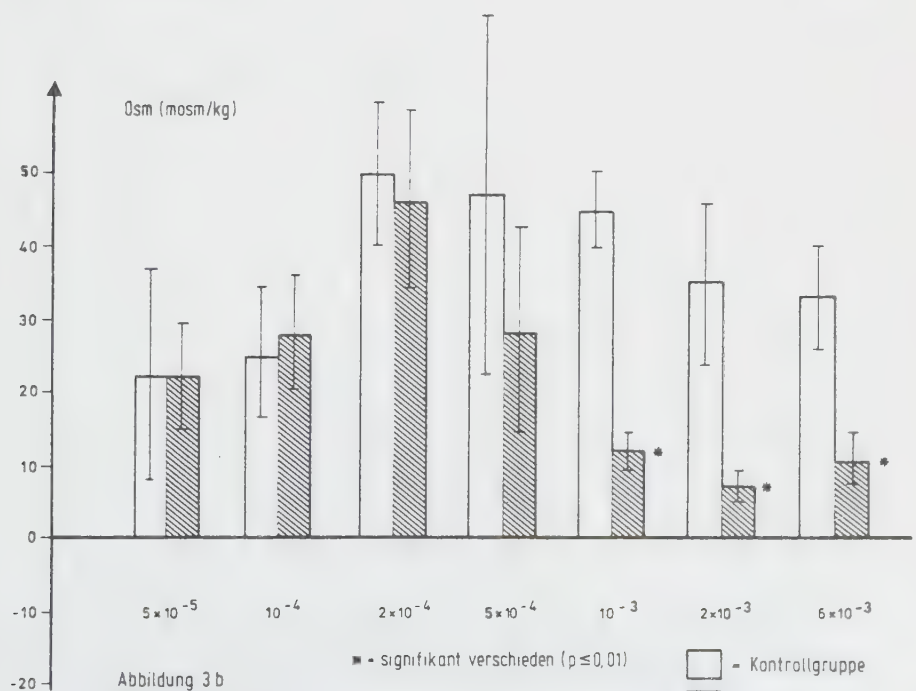
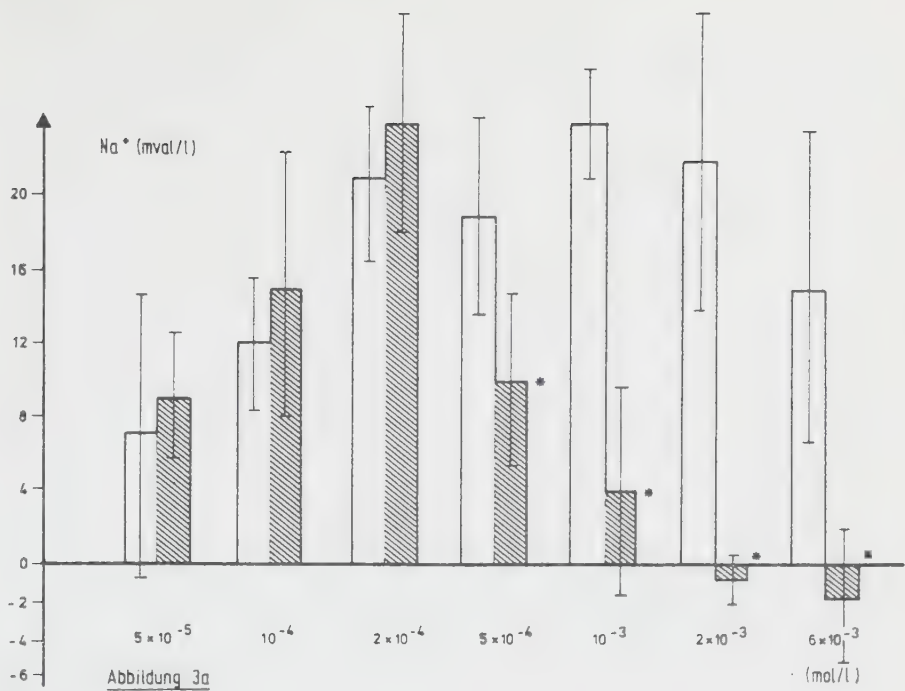


Abbildung 3: Verhalten der Na^+ -Konzentration (a) und der Osmolalität (b) auf der Serosaseite des Dickdarms.

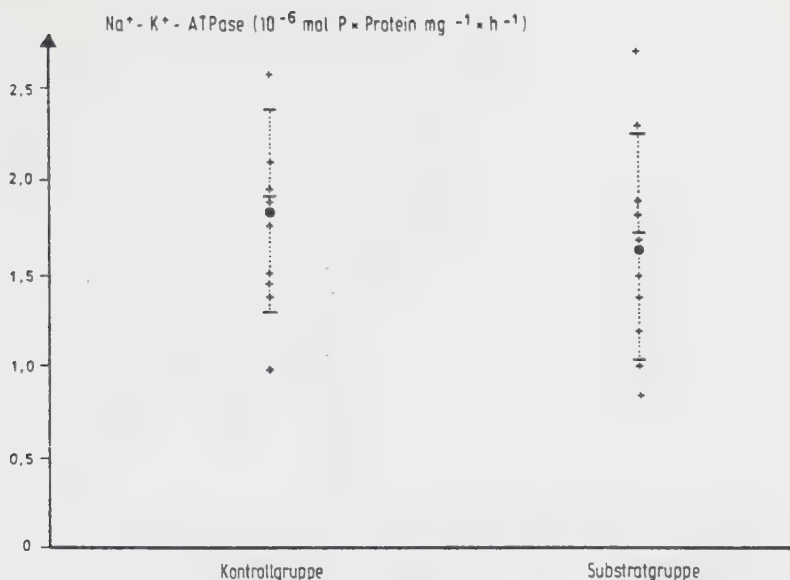


Abbildung 4: Darstellung der $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ -Aktivitäten des Mukosagewebes.

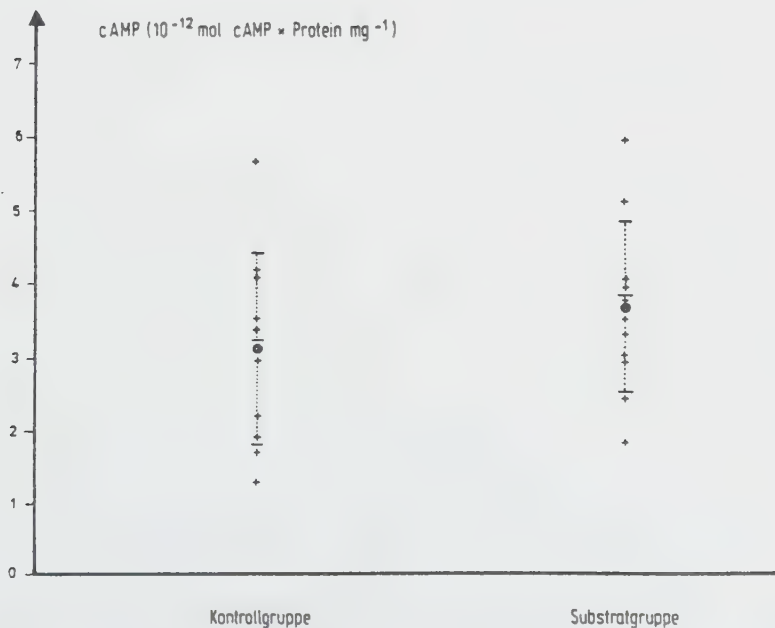


Abbildung 5: Ergebnisse der Konzentrationsmessung des cAMP im Mukosagewebe.

IV. D i s k u s s i o n

=====

Der Natriumtransport im Dickdarm der Ratte, der entgegen einem elektrochemischen Gradienten erfolgt, ist aktiv. Chlorid passiert die Membran mittels freier Diffusion. Der Wassertransport erfolgt passiv gemäß dem osmotischen Gradienten (Curran u. Schwarz, 1960). Binder u. Rawlins (1973) diskutieren zwei Austauschmechanismen für die Elektrolytresorption: $\text{Na} - \text{H}$, $\text{Cl} - \text{HCO}_3$. Für den Absorptionsverlust an Elektrolyten und Wasser kommen folgende pathogenetische Vorgänge in Frage:

1. Hemmung der Absorption, 2. Anregung der Sekretion und
3. erhöhte Durchlässigkeit der Mukosa (Forth et al., 1966).

Die in dieser Studie durchgeführte Applikation von Etacrynsäure auf der mukosalen Seite eines isolierten Dickdarmpräparates der Ratte zeigt eine dosisabhängige Wirkung auf den Elektrolyt- und Wassertransfer.

Die Nettoresorptionsraten der Kontrollgruppen für Elektrolyte und Wasser bleiben hinter den in methodisch vergleichbaren Experimenten erzielten Ergebnissen von You u. Makhlof (1975) zurück, entsprechen jedoch denen von Parsons (1956).

Die Absorption von Na^+ und Cl^- wird in der höchsten untersuchten Etacrynsäurekonzentration ($6 \times 10^{-3} \text{M}$) fast komplett gehemmt. Die Transportrate für Wasser wird auf 29% herabgesetzt. Bei den sieben applizierten Konzentrationen konnte jedoch keine Sekretion festgestellt werden. Diese Tatsache entspricht der Annahme von Rummel et al. (1975), die eine Sekretion bei in vitro durchgeführten Versuchen deshalb nicht für möglich halten, da der Plasma- druck auf der serosalen Seite fehlt.

Die halbmaximale Hemmung der Transportraten wurde bei $5 \times 10^{-4} \text{M}$ Etacrynsäure gemessen. Am Dünndarm der Ratte hatten Strombeck u. Ingraham (1972) bei $2 \times 10^{-4} \text{M}$ Etacryn-

säure keine Beeinflussung des Na^+ -Transportes gefunden, während am Dickdarm diese Dosis bereits wirksam ist. Höhere Konzentrationen zeigen aber auch eine Absorptionshemmung durch Etacrynsäure am Dünndarm (Robinson u. Förster, 1968).

Während einige Studien keine Wirkung von Etacrynsäure an der Rattenniere fanden (Beyer et al., 1965; Wilczewski et al., 1974), zeigten andere Autoren den Beginn absorptionshemmender Wirkung in demselben Konzentrationsbereich wie die vorliegende Versuchsreihe am Kolon. Der halbmaximale Effekt an der Rattenniere ist jedoch schon bei $2 \times 10^{-4}\text{M}$ Etacrynsäure erreicht (Schurek et al., 1975); am Dickdarm findet man bei $5 \times 10^{-4}\text{M}$ erst den halbmaximalen Effekt. Diese Dosis wirkt an der Niere bereits maximal (Bowman et al., 1973).

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe zeigen gleiche Nettoabsorptionsraten für Na^+ und Cl^- in den Kontroll- und den Substratgruppen. Damit besteht korrelierte Absorption für Na^+ und Cl^- unter den beschriebenen Versuchsbedingungen, wie Curran u. Schwarz bereits 1960 zeigten. Die Hemmung der Wassertransporte bleibt im Beginn und auch in der maximalen Wirkung geringfügig hinter den Hemmungsraten der Elektrolyte zurück (Abbildung 2).

Das Verhalten der Osmolalität nach zweistündiger Inkubation zeigt Parallelen mit den Konzentrationsänderungen des Na^+ auf der serosalen Seite. Unter Kontrollbedingungen steigen die Na^+ -Konzentrationen um 15 - 20 mval/l an. In den Substratgruppen ist eine dosisabhängige Reduzierung dieses Konzentrationsanstieges meßbar. Die Daten der Osmolalitätsmessungen entsprechen diesen Werten, wenn man zu dem Na^+ -Konzentrationsanstieg das Anionenäquivalent addiert (Abbildung 3a + 3b).

Die Applikation der Etacrynsäure auf der Serosa-Seite des Kolonpräparates zeigt auch eine dosisabhängige Wirkung auf den Elektrolyt- und Wassertransfer, jedoch beginnt die Resorptionseinschränkung erst in Konzentrationen, die 10fach höher liegen als auf der mukosalen Darmseite.

Es bleibt in dieser Studie unbeantwortet, ob dieser überraschende Effekt der Etacrynsäure durch Beeinflussung der serosalen Zellwand oder erst nach aktivem oder passivem Transport der Substanz auf die Mukosa-Seite erreicht wird.

Hook u. Williamson (1965) konnten neben anderen Autoren zwar keinen natriuretischen Effekt der Etacrynsäure an der Rattenniere nachweisen, zeigten aber eine Reduzierung der Na^+-K^+ -ATPase-Aktivität an diesem Organ. Im Wirkungsmechanismus dieses Diuretikums an der Rattenniere spielt die ATPase eine wesentliche Rolle, da auch Duggan u. Noll (1965) bei $5 \times 10^{-4}\text{M}$ Etacrynsäurekonzentration eine 50%ige Hemmung der ATPase-Aktivität in der Rattenniere feststellten.

Diese Dosis wurde auch in der vorliegenden Studie am Kolon der Ratte untersucht. Hier weisen die Ergebnisse jedoch keinen Effekt auf die Na^+-K^+ -ATPase-Aktivität auf, während die Elektrolyt- und Wasserabsorptionen auf ca. 50% reduziert sind (Abbildung 4). Dabei liegen die Kontrollwerte in dem Aktivitätsbereich, den Loeschke et al. (1974) für das Caecum der Ratte beschrieben haben.

Die Na^+-K^+ -ATPase hat somit keinen mit der Niere vergleichbaren Anteil am Wirkungsmechanismus der Etacrynsäure an der Dickdarmmukosa der Ratte.

Die Wasser- und Elektrolytverschiebungen in der Rattenniere (Ebel, 1974; Jakobs et al., 1972; Nechay, 1977) und auch im Dickdarm dieser Spezies (Binder et al., 1975; Hornyh et al., 1973) sind auf Änderungen des cAMP-Gehaltes zurückzuführen. Einige Studien weisen eine Beeinflussung der cAMP-Konzentration durch Etacrynsäure nach (Al-Awqati et al., 1974; Matuschansky et al., 1976).

Die in dieser Versuchsreihe durchgeführte Bestimmung des cAMP-Gehaltes am Kolonpräparat der Ratte zeigt keine Beeinflussung durch Etacrynsäure. Schon Ussing et al. (1974) bezweifelten eine pharmakologische Wirkung der Etacrynsäure auf das cAMP.

Die vorliegende Einschränkung der Absorption von Wasser und Elektrolyten an der Kolonschleimhaut der Ratte kann als Erklärung für die seltenen Durchfälle unter der Therapie mit hohen Etacrynsäuredosen angeführt werden.

Während die Beeinflussung der $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase-Aktivität und der cAMP-Gehalt neben anderen Mechanismen bei der diuretischen Wirkung der Etacrynsäure an der Niere eine Rolle spielen, ist dieser Effekt an der Dickdarmmukosa der Ratte nicht nachweisbar. Die Klärung des Wirkungsmechanismus muß anderen experimentellen Studien vorbehalten bleiben.

V. Zusammenfassung

=====

Durchfälle, die während einer Therapie mit hohen Etacrynsäuredosen auftreten können, wären mit einer Nettoresorptionsstörung für Wasser und Elektrolyte im Colon erklärbar.

In dieser Studie wurde die Wirkung von Etacrynsäure auf den Wasser- und Elektrolyttransfer $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase-Aktivität und cAMP-Konzentration an der isolierten Dickdarmschleimhaut der Ratte untersucht.

Unter übersichtlichen Bedingungen wurde das isolierte Rattencolon plasmatischer Elektrolytlösung über zwei Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Transferraten für Na^+ , Cl^- und Wasser, der $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase-Aktivität und der cAMP-Konzentration.

Die Absorption von Na^+ , Cl^- und Wasser wurde dosisabhängig durch das Diuretikum gehemmt. Eine 50%ige Reduzierung der Transferraten war bei $5 \times 10^{-4} \text{M}$ Etacrynsäure-Dosierung auf der Mukosa-Seite feststellbar. Ein Einfluß auf die $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase und das cAMP der Mukosa lag in dieser Konzentration nicht vor.

Zur Erklärung der beobachteten Durchfälle dienen zwar die gewonnenen Erkenntnisse zur Absorptionshemmung von Elektrolyten und Wasser, jedoch sind die hier untersuchten Wirkungsmechanismen nicht dafür verantwortlich.

VI. L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s
=====

Abdelhamid, S.:

Radioimmunoassay und seine klinische Anwendung.

Med. Welt 25 (37), 1489 - 1492 (1974)

Al-Awqati, Q., M. Field, W.B. Greenough:

Reversal of cyclic AMP-mediated intestinal secretion by
ethacrynic acid.

The Journal of Clinical Investigation 53 (March), 687 -
692 (1974)

Beyer, K.H., J.E. Baer, J.K. Michaelson, H.F. Russo:

Renotropic characteristics of ethacrynic acid:

A phenoxyacetic saluretic-diuretic agent.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 147, 1 - 22 (1965)

Binder, H.J., C. Filburn, B.T. Volpe:

Bile salt alteration of colonic electrolyte transport:
Role of cyclic adenosine monophosphate.

Gastroenterology 68, 503 - 508 (1975)

Binder, H.J., C.L. Rawlins:

Electrolyte transport across isolated large intestinal
mucosa.

Am. Journal of Physiology 225 (5), 1232 - 1239 (1973)

Bowman, R. H., J. Dolgin, R. Coulson:

Furosemide, ethacrynic acid, and iodoacetate on function
and metabolism in perfused rat kidney.

Am. J. Physiol. 224 (2), 416 - 424 (1973)

Cooperman, L.B., I.L. Rubin:

Toxicity of ethacrynic acid and furosemide.

American Heart Journal 85 (6), 831 - 834 (1973)

Curran, P.F., G.F. Schwartz:

Na, Cl, and water transport by rat colon.

The Journal of General Physiology 43, 555 - 571 (1960)

Davis, P.W.:

Inhibition of renal Na^+ - K^+ -activated adenosine triphosphatase activity by ethacrynic acid.

Biochemical Pharmacology 19, 1983 - 1989 (1970)

Duggan, D.E., R.M. Noll:

Effects of ethacrynic acid and cardiac glycosides upon a membrane adenosinetriphosphatase of renal cortex.

Arch. of Biochemistry and Biophysics 109, 388 - 396 (1965)

Ebel, H.:

Effect of diuretics on renal Na^+ - K^+ -ATPase and adenyl cyclase.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 281, 301 - 314 (1974)

Ebel, H., J. Ehrich, N.G. DeSanto, U. Doerken:

Plasma membranes of the kidney III. Influence of diuretics on ATPase activity.

Pflüger's Arch. 335, 224 - 234 (1972)

Ebel, H., A. Ozer, G.W.G. Sharp:

Renal adenyl cyclase as a diuretic receptor.

Pflüger's Arch. 343, Suppl., R 47 (1973)

Field, M.:

Intestinal secretion.

Gastroenterology 66, 1063 - 1084 (1974)

Field, M.:

Ion transport in rabbit ileal mucosa. II. Effects of cyclic 3', 5'-AMP.

Am. J. Physiol. 221 (4), 992 - 997 (1971)

Fiske, C.H., J. Subbarow:

The colorimetric determination of phosphorus.

J. Biol. Chem. 66, 375 - 379 (1925)

Forth, W., W. Rummel, J. Baldauf:

Wasser- und Elektrolytbewegung am Dünn- und Dickdarm unter dem Einfluß von Laxantien, ein Beitrag zur Klärung ihres Wirkungsmechanismus.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 254, 18 - 32 (1966)

Fülgraff, G., A. Meiforth:

Effects of cyclic nucleotide monophosphates (cAMP, cGMP, cIMP, DB-cAMP) on transtubular net fluxes in rat kidneys.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 283, 425 - 429 (1974)

Gilman, A.G.:

A protein binding assay for adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate.

Proceedings of the National Academy of Sciences 67 (1), 305 - 312 (1970)

Hagedorn, C.W., A.A. Kaplan, W.H. Hulet:

Prolonged administration of ethacrynic acid in patients with chronic renal disease.

The New England Journal of Medicine 272, 1152 - 1155 (1965)

Hilton, J.G., E. Kessler:

Toxic reactions to ethacrynic acid.

J. New Drugs 4, 93 (1964)

Hook, J.B., H.E. Williamson:

Lack of correlation between natriuretic activity and
Inhibition of renal $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -activated ATPase.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 120, 358 - 360 (1965)

Hornych, A., P. Meyer, P. Milliez:

Angiotensin, vasopressin, and cyclic AMP: effects on
sodium and water fluxes in rat colon.

Am. J. Physiol. 224 (5), 1223 - 1229 (1973)

Jakobs, K.H., K. Schultz, G. Schultz:

Hemmung von Adenyl-Cyclase-Präparationen aus der Ratten-
niere durch Calciumionen und verschiedene Diuretica.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 273, 248 - 266
(1972)

Jacobson, E.D., D.C. Bondy, S.A. Broitman, J.S. Fordtran:

Validity of polyethylene glycol in estimating intestinal
water volume.

Gastroenterology 44, 761 - 767 (1963)

Katz, A.I., F.H. Epstein:

Physiologic role of sodium-potassium-activated adenosine
triphosphatase in the transport of cations across biologic
membranes.

The New England Journal of Medicine 278 (5), 253 - 261
(1968)

Katz, A.I., F.H. Epstein:

The role of sodium-potassium-activated adenosine triphos-
phatase in the reabsorption of sodium by the kidney.

The Journal of Clinical Investigation 46 (12), 1999 - 2011
(1967)

Kimberg, D.V.:

Cyclic nucleotides and their role in gastrointestinal secretion.

Gastroenterology 67, 1023 - 1064 (1974)

Loeschke, K., E. Uhlich, R. Konne:

Stimulation of sodium transport and $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ activity in the hypertrophying rat cecum.

Pflüger's Arch. 346, 233 - 249 (1974)

Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall:

Protein measurement with the Folin phenol reagent.

J. biol. Chem. 103, 265 - 275 (1951)

Matuschansky, C., J.-Y. Mary, J.-J. Bernier:

Further studies on Prostaglandin E_1 -induced jejunal secretion of water and electrolytes in man, with special reference to the influence of ethacrynic acid, furosemide, and aspirin.

Gastroenterology 71, 274 - 281 (1976)

Nechay, B.R.:

Biochemical basis of diuretic action.

The Journal of Clinical Pharmacology, October 1977, 626 - 641 (1977)

Nechay, B.R.:

Relationship between inhibition of renal $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ and natriuresis.

Annals New York Academy of Science 242, 501 - 518 (1974)

Nechay, B.R., R.F. Palmer, D.A. Chinoy, V.A. Posey:

The problem of $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-adenosine triphosphatase}$ as a receptor for diuretic action of mercurials and ethacrynic acid.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 157, 599 - 617 (1967)

Parkinson, D.K., H.Ebel, D.R. Dibona, G.W.G. Sharp:
Localization of the action of cholera toxin on adenyl
cyclase in mucosal epithelial cells of rabbit intestine.
The Journal of Clinical Investigation 51, September,
2292 - 2298 (1972)

Parsons, D.S.:

The absorption of bicarbonate-saline solutions by the
small intestine and colon of the white rat.

Quart. J. Exp. Physiol. 41, 410 - 420 (1956)

Parsons, D.S., C.R. Paterson:

Fluid and solute transport across rat colonic mucosa.

Quart. J. Exp. Physiol. 50, 220 - 231 (1965)

Parsons, D.S., C.R. Paterson:

Movements of fluid and glucose in an everted sac
preparation of rat colonic mucosa.

Biochim. Biophys. Acta 41, 173 - 175 (1960)

Robinson, J.W.L., H. Förster:

Effect of ethacrynic acid and furosemide on the transport
systems of the rat intestine.

Naturwissenschaften 55 (5), 232 - 233 (1968)

Robison, G. A., R.W. Butcher, E.W. Sutherland:

Cyclic AMP.

Ann. Rev. Biochem. 37, 149 - 174 (1968)

Rummel, W., G. Nell, R. Wanitschke:

Action mechanisms of antiabsorptive and hydragogue
drugs.

Intestinal Absorption and Malabsorption, edited by T.Z.
Csaky.

Raven Press, New York (1975), 209 - 227

Rummel, W., H.F. Stupp:

The influence of diuretics on the absorption of salts, glucose, and water from the isolated small intestine of the rat.

Experientia 18 (7), 303 - 309 (1962)

Sedmark, J.J., S.E. Grossberg:

A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie Brilliant Blue G250.

Analytical Biochemistry 79, 544 - 552 (1977)

Senft, G., W. Losert, A. Lübbemeier:

Nachweis der Natrium-eliminierenden Wirkung von Etacrynsäure bei der Ratte.

Arzneim.-Forsch. 18, 563 - 567 (1968)

Senft, G., K. Munske, G. Schultz, M. Hoffmann:

Der Einfluß von Hydrochlorothiazid und anderen sulfonamidierten Diuretika auf die 3', 5'-AMP-Phosphodiesterase-Aktivität in der Rattenniere.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak. u. exp. Path. 259, 344 - 359 (1968)

Shields, R., J. Harris, M.W. Davies:

Suitability of polyethylene glycol as a dilution indicator in the human colon.

Gastroenterology 54 (3), 331 - 333 (1968)

Sutherland, E.W., G.A. Robison, R.W. Butcher:

Some aspects of the biological role of adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP).

Circulation 37, 279 - 306 (1968)

Schafer, D.E., W.D. Lust, B. Sirear, N.D. Goldberg:

Elevated concentration of adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate in intestinal mucosa after treatment with cholera toxin.

Proceedings of the National Academy of Sciences 67 (2), 851 - 856 (1970)

Schultz, G., E. Böhme, J.G. Hardman:
Separation and purification of cyclic nucleotides
by ion-exchange resin column chromatography.
in: Methods in Enzymology, Vol. XXVIII, Hormone
Action (Part C: Cyclic Nucleotides), pp 9 - 20,
J.E. Hardman, and B.W. O'Malley eds., Acad. Press,
New York (1974)

Schurek, H.J., E. Aulbert, H. Ebel:
Influence of ouabain and ethacrynic acid on sodium
transport and $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase activity in the isolated
perfused rat kidney.
in: Current Problems in Clinical Biochemistry, Vol.4,
Biochemical Aspects of Renal Function, pp 162 - 168,
S. Angielski and U.C. Dubach eds., Hans Huber, Bern (1975)

Steiner, A.L., C.W. Parker, D.M. Kipnis:
The measurement of cyclic nucleotides by radioimmunoassay.
Adv. Biochem. Psychopharmacol. 3, 89 - 111 (1970)

Strombeck, D.R., R.C. Ingraham:
Effect of diuretics on sodium and potassium transport
in the rat's ileum.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 139, 383 - 386 (1972)

Ussing, H.H., D. Erlij, U. Lassen:
Transport pathways in biological membranes.
Ann. Rev. Physiol. 36, 17 - 49 (1974)

Wanitschke, R., G. Nell, W. Rummel:
Influence of hydrostatic pressure gradients on net
transfer of sodium and water across isolated rat
colonic mucosa.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. 297, 191 - 194 (1977)

Wanitschke, R., G. Nell, W. Rummel:

Transfer of sodium and water through isolated rat colonic mucosa under the influence of deoxycholate and oxyphenisatin.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 297, 185 - 190 (1977)

Wilczewski, T.W., A.K. Olson, G. Carrasquer:

Effect of amiloride, furosemide, and ethacrynic acid on Na transport in the rat kidney.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 145, 1301 - 1305 (1974)

Wingate, D.L., R.J. Sandberg, S.F. Phillips:

Technique: A comparison of stable and ^{14}C -labelled polyethylene glycol as volume indicators in the human jejunum.

Gut 13, 812 - 815 (1972)

Yau, W.M., G.M. Makhoul:

Comparison of transport mechanisms in isolated ascending and descending rat colon.

Am. J. Physiol. 228 (1), 191 - 195 (1975)

Zins, G.R., R.A. Walk, R.Z. Gussin, C.R. Ross:

The diuretic activity of ethacrynic acid in rats.

The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 163 (1), 210 - 215 (1968)

Ich danke Herrn Prof. Dr. R. Wanitschke für die Überlassung des Themas sowie die Betreuung bei der Arbeit, ferner für die Hilfestellung bei zahlreichen Fragen Herrn Prof. Dr. K. Ewe, Herrn Prof. Dr. W. Rummel, Herrn Dr. K.-J. Goerg und Frau Dipl.-Math. M. Budenz.

L e b e n s l a u f =====

Am 23. März 1955 wurde ich, Hans-Georg Albrecht, als einziges Kind der Eheleute Georg Albrecht und Hannelore Albrecht geborene Ringert in Dortmund geboren.

Dort verbrachte ich meine Kindheit und besuchte ab April 1961 die Grundschule, bevor 1965 der Wechsel zum Dortmunder Humboldt-Gymnasium erfolgte. Hier bestand ich im Mai 1973 die Reifeprüfung. Anschließend zog die Familie nach Zornheim / Kreis Mainz-Bingen um.

Im April 1974 nahm ich an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz das Studium der Humanmedizin auf, bestand am 14. Mai 1980 dort auch das Medizinische Staatsexamen.

Seit September 1980 leiste ich meinen Wehrdienst als Truppenarzt bei der Bundeswehr ab und versorge zur Zeit den Standort Wangerland / Kreis Friesland.

Hans-Georg Albrecht
Alb. Schweitzer-Str. 2
6501 Zornheim

